

IN-VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG
DES LIPOIDSTOFFWECHSELS IN DEN
NEBENNIEREN VON RATTEN NACH EINER
FORMALINVERGIFTUNG

GOTTHARD JOSEF MÜLLER

1971

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

IN-VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG
DES LIPOIDSTOFFWECHSELS IN DEN NEBENNIEREN
VON RATTEN NACH EINER FORMALINVERGIFTUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gotthard Josef Müller
aus Tetschen (CSR)

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.D.EBERHAGEN

Mitberichterstatter: Prof.Dr.W.SEITZ

Dekan: Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 1971

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>Einleitung</u>	
Das Verhalten der Gesamtlipoide	5
Das Verhalten der Cholesterinester und ihrer Fettsäuren	5
Acetat als Substrat der Steroidbiosynthese	6
Problemstellung und Zielsetzung	7
<u>Beschreibung der Versuche</u>	
Vorbereitung der Tiere	9
Erste Versuchsreihe	9
Zweite Versuchsreihe	11
Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	12
Reagenzien	13
<u>Ergebnisse</u>	14
<u>Diskussion</u>	28
<u>Zusammenfassung</u>	33
<u>Literaturverzeichnis</u>	34

EINLEITUNG

Das Verhalten der Gesamtlipide

Gehalt und Zusammensetzung der Nebennierenlipide sind außer von der Ernährung(1,2,3) vor allem vom Funktionszustand der Organe abhängig, wie zahlreiche Beobachtungen schon um die Jahrhundertwende ergaben(4,5). Auf Grund dieser vielfältigen Versuchsergebnisse stellten Goormaghtigh und Elaut(6) 1925 die Hypothese auf, daß die Lipide in den Rindenzellen zum Aufbau der Rindenhormone(Corticoide) verwendet werden. Dabei sollen bei hoher Sekretions- und Syntheserate der Hormone die Zellen von den Fettstoffen entspeichert werden. Zu Zeiten geringerer Nebennierenaktivität werden die Lipide wieder für den Bedarfsfall gespeichert. Bei langandauernder Ausschüttung der Rindenhormone kommt es zur Erschöpfung der Lipoidreserven, also histologisch ebenfalls zum Bild einer Entspeicherung der Nebennierenrinde. Zahlreiche Untersuchungen bestätigten den Zusammenhang zwischen dem Lipoidgehalt und der Aktivität des Organs(Übersicht siehe Wolman(7) 1964). Selye baute dieses Konzept dann zu seiner Theorie vom dreiphasigen "allgemeinen Adaptations-syndrom"(8,9,10) aus.

Das Verhalten der Cholesterinester und ihrer Fettsäuren

Der Cholesteringehalt der Nebenniere steht in enger Beziehung zum ACTH-Spiegel des Blutes und damit zur Corticoidsekretion, wie sich durch Gabe dieses Hypophysenhormons an Ratten zeigen ließ(11,12,13,14). Ähnlich wie der Cholesteringehalt verhält sich auch der Vitamin C Gehalt(15). Popjak(16) gelang der Nachweis, daß für die Schwankungen des Gesamtcholesteringehaltes ausschließlich die Cholesterinester verantwortlich sind, während der Gehalt an freiem Cholesterin

bemerkenswert konstant bleibt. Da bereits der Arbeitskreis um Hechter(17,18) die Bedeutung des Cholesterins als Stoffwechselvorläufer der Corticoide bei Perfusionsversuchen mit Rindernebennieren gezeigt hatte, schien es demnach möglich, die Ester als die eigentlichen Ausgangsstoffe der Hormonsynthese anzusehen(19,20).

Dailey und Mitarbeiter(19,21,22,23) fanden, daß bei der Inkubation mit Nebennierenhomogenat besonders das mit ungesättigten Fettsäuren veresterte Cholesterin in markierte Corticoide umgesetzt wurde. Japanische Autoren halten so das Cholesterinarachidonat für den eigentlichen Vorläufer der Nebennierenrindenhormone(24,25,26). Es gelang ihnen, einen Zusammenhang zwischen den essentiellen Fettsäuren und damit den hochungesättigten Fettsäuren einerseits und der Steroidsynthese andererseits zu finden(24,25,27,28). Der tierische Organismus bildet aus den essentiellen Fettsäuren die hochungesättigten Fettsäuren selbst(29). Bei Tieren, die mit einer entsprechenden Mangel diät ernährt wurden, war der Hormonausstoß nach ACTH-Gabe gegenüber Kontrollen stark vermindert. Hingegen sieht der Arbeitskreis um Lieberman im Cholesterinsulfat die aktive Stoffwechselform des Cholesterins. Er konnte die in-vivo Umsetzung von Cholesterinsulfat zu Dehydroisoandrosteron nachweisen(30) und diese Verbindung aus Rindernebennieren isolieren(31).

Das Acetat als Substrat der Steroidbiosynthese

Über die Rolle des Acetats bei der Corticoidsynthese liegen viele Beobachtungen vor(32,33,34,35). Ein Vergleich der spezifischen Aktivität der C-21-Steroide und des Cholesterins im endokrinen Gewebe bei Inkubationsversuchen zeigte, daß mehr radioaktives Acetat in die Steroide als in das Cholesterin eingebaut wurde(34,36,37). Dies führte zur Annahme, daß entweder ein großer Teil des Cholesterins nicht für die Hormonsynthese zur Verfügung steht(38) oder daß neben dem Syntheseweg Acetat-Cholesterin-Corticoid ein zweiter existiert,

der direkt vom Acetat zu den Steroiden führt(17,37).Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse von Kahnt und Neher(39), die mit Blockern der Cholesterinbiosynthese auch eine totale Hemmung der Corticoidbildung erwirken konnten.Ichii und Péron(40,41) kamen auf Grund ihrer Versuche mit Rattennebnieren zu dem Schluß,daß das Corticosteron aus dem freien Cholesterin der Mitochondrien gebildet wird,wovon aber nur ein Teil für die Hormonsynthese zur Verfügung zu stehen scheint(42).Cushman glaubt,daß die Corticoidproduktion beim Hund eher von der de-novo Synthese der Cholesterinvorläufer als von der Menge der vorhandenen Cholesterinvorräte abhängt(43).

Schon 1948 hatte Srere(44) nachgewiesen,daß das Cholesterin in den Nebennieren selbst aus Acetat gebildet werden kann. Die Umwandlung des Cholesterins zur ersten Vorstufe der Corticoide,dem Pregnenolon,geht nach Dorfmann und Mitarbeiter (45) durch oxidative Abspaltung der Seitenketten nach Einführung von Hydroxylgruppen an C-20 und C-22 vor sich.Die Hydroxylierung geschieht unter Beteiligung von Sauerstoff und NADPH(45,46,47,48).

Problemstellung und Zielsetzung

Die Cholesterinester sind-entweder als Depot oder als aktiveStoffwechselform des freien Cholesterins-von großer Bedeutung für die Synthese der Steroidhormone.Dienen die Ester nur als Cholesterinreserve,so könnte die Koppelung vor allem mit den flüssigen,ungesättigten Fettsäuren den Zweck haben, ein kristallines Ausfallen des freien Cholesterins im Gewebe zu verhindern und so den Enzymangriff für die weiteren Reaktionen zu erleichtern.Der Schmelzpunkt des Cholesterinoleats oder-linolats liegt mit 35°C bzw. 43°C(49) um 100 Grad tiefer als der des freien Cholesterins.

Nach Untersuchungen von Eberhagen(50) kommt es im Verlauf

einer ACTH-oder stressbedingten Stimulierung von Ratten-nebennieren zu typischen, zeitlich genau festliegenden Veränderungen ihres Cholesteringehaltes, die von Art und Ausmaß der Reizung abhängig sind. Dabei verhalten sich die Ester nach ihrem Fettsäureanteil in verschiedener Weise.

Durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche sollte geklärt werden, wie sich ein Formalinstress von verschiedener Dauer auf die de-novo Synthese von Cholesterin und Fettsäuren aus Acetat bzw. auf die Cholesterinesteraseaktivität der Nebennieren auswirkt. Gleichzeitig wurden die Schwankungen des Gehaltes an diesen Lipoiden in dem Organ untersucht.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Vorbereitung der Tiere

Für die Versuche wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten der gleichen Zucht mit einem Körpergewicht zwischen 100 und 140 g, einem Alter von 6 bis 9 Wochen entsprechend, verwendet. Die Ratten waren unter identischen Bedingungen aufgewachsen, erhielten eine Standarddiät (Altromin-Futter) ad libitum und besaßen etwa das gleiche Gewicht. Während die als Kontrollgruppe vorgesehenen Tiere sofort getötet wurden, erhielten die eigentlichen Versuchstiere je 0,5 ccm einer 2%igen Formalinlösung intraperitoneal injiziert. Jeweils sechs bis neun Tiere wurden zu den angegebenen Zeiten nach der Injektion durch Eröffnen des Herzmuskels in Äthernarkose getötet.

Erste Versuchsreihe

Inkubation der Nebennieren, Gewinnung und Reinigung der Gesamtlipide

Die erste Versuchsreihe sollte zur Bestimmung des Fettsäure- und Cholesteringehaltes und der Neusynthese dieser Lipide aus Acetat nach einem Formalinstress dienen. Die Nebennieren wurden sofort nach dem Ausbluten entnommen und jeweils beide Organe einer Ratte zusammen weiterverarbeitet. Nach sorgfältiger Entfernung des anhaftenden Fettgewebes - die bindegewebige Kapsel konnte wegen der Kleinheit der Organe nicht mit entfernt werden - wurden die eisgekühlten Nebennieren unmittelbar anschließend auf einer Halbmikrowaage gewogen. Danach wurden sie in dem Inkubationsgefäß mit einer Schere geviertelt, 2 ml eisgekühlter Krebs-Ringer Puffer mit einem 5%igen Humanalbuminzusatz und $20 \mu\text{Ci } 1\text{-}^{14}\text{C}$ Acetat zugegeben. Nach Verdrängen der Luftatmosphäre durch Carbogen wurden die Inkubationsgefäße bei 37°C für drei Stunden geschüttelt, dann das

Inkubat in einem Potter-Elvehjem Glashomogenisator homogenisiert und in die 20-fache Menge Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) eingetragen.

Nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde abfiltriert und das Filtrat mit dem 0,2fachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung in einem Meßzylinder geschüttelt. Nach vollständiger Trennung der beiden Phasen wurde die wässrige, obere Schicht abgesaugt und aus der unteren Phase durch wiederholtes Auswaschen mit einer künstlichen oberen Phase alle wasserlösliche Radioaktivität entfernt. Die künstliche obere Phase erhielt man durch Schütteln von vier Teilen eines Chloroform-Methanol-Gemisches 2:1(v/v) und einem Teil physiologischer Kochsalzlösung. Die untere Phase mit den nach Folch und Mitarbeitern gereinigten Lipiden(51) wurde im Rotationsverdampfer bei Badtemperaturen nicht über 40°C eingedampft, nacheinander in absolutem Äthanol und Chloroform aufgenommen und wieder zur Trockene gebracht.

In Anbetracht des sehr geringen, zur Verfügung stehenden Materials wurde für die weitere Aufarbeitung der Lipoidfraktionen die von Eberhagen entwickelte Mikroarbeitsmethode verwendet(50). Die bei den vorliegenden Versuchen angewandte Mikrotechnik benützt ausnahmslos Reagenz- und Lösungsmittelmengen von 1 bis 2 ml. In Leerversuchen, d.h. bei der Durchführung eines kompletten Analysenganges ohne Substanzeinsatz, konnten keine auf Schmutzeffekte beruhenden "Substanzen" nachgewiesen werden. Die apparative Ausrüstung ist bei Eberhagen angegeben.

Verseifung, Veresterung und Auftrennung der Gesamtlipoide

Zur hydrolytischen Spaltung wurden die Lipoide in einem Schliffreagenzglas mit 2 ml 10%iger methanolischer NaOH, die 5% Wasser enthielt, aufgenommen, ungefähr 1mm große Tonstücke als Siedesteine zugegeben und danach für 2 Stunden bei Rückflußkühlung gekocht. Nach dem Erkalten der Lösung und Ansäuern

mit 1 ccm 18%iger HCl erfolgte die Extraktion der lipoid-löslichen Bestandteile. Dazu wurden 2 ml Petroläther (Kp 50-70°C) zugesetzt und das Phasensystem für eine halbe Minute intensiv aufgewirbelt. Die petrolätherische obere Phase mit den Lipoiden wurde nach vollständiger Trennung mit einer Lösungsmittelpipette abgesaugt. Insgesamt genügten 3 Extraktionsvorgänge mit je 2 ml Petroläther zur vollständigen Erfassung der lipoiden Substanzen (50).

Zur Veresterung der freien Fettsäuren wurde der Petroläther bei 80°C im Trockenschrank abgedampft, die Lipide wieder in 1 ccm Diäthyläther gelöst und die gleiche Menge Diazomethanreagenz (52,53) zugegeben. Nach 24-stündigem Stehen im Kühlschrank wurde überschüssiges Diazomethan kenntlich an der gelben Farbe durch Zugabe einer verdünnten petrolätherischen Ameisensäurelösung beseitigt. Zur dünn-schichtchromatographischen Trennung wurde das Lösungsmittel wieder im Trockenschrank bei 80°C abgedampft und die in Chloroform gelösten Lipide auf 1 mm dicke Kieselgel-G Dünnschichtplatten übertragen. Als Fließmittelsystem diente ein Petroläther, Diäthyläther, Essigsäuregemisch 90:10:1 (v/v/v). Von den dem freien Cholesterin und den Fettsäuremethylestern zugeordneten Bereichen der Chromatogramme wurde die Kieselgelschicht in Zentrifugenröhrchen übergeführt und durch dreimalige Elution mit Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) unter ständiger Durchmischung der Probe extrahiert. Der Chloroformauszug wurde auf 10 ml aufgefüllt und in aliquoten Teilen der Cholesterin- bzw. der Acylestergehalt sowie die Radioaktivität bestimmt (siehe unten).

Zweite Versuchsreihe

In der zweiten Versuchsreihe sollten die Änderungen der Cholesterinesteraseaktivität und des Gehaltes an freiem und verestertem Cholesterin im Verlauf einer Formalinver-

giftung untersucht werden. Die Nebennieren wurden sofort nach dem Wiegen mit 1 ml Krebs-Ringer Puffer bei Eiskühlung homogenisiert und mit einem weiteren ml Puffer quantitativ in die Inkubationsgefäße übertragen. Dann wurde 0,2 ml einer Cholesterin-Albuminlösung mit einer Radioaktivität von 0,05 μCi zugegeben und wie bei der ersten Versuchsreihe inkubiert. Da dieser Aktivität nur 0,8 μg Cholesterin entsprachen, wurde der Cholesteringehalt im Inkubat praktisch nicht verändert. Die 4- ^{14}C -Cholesterin-Albuminlösung wurde nach den Angaben von Portman und Havel(54) hergestellt. Nach 3 Stunden wurde das Inkubat in die 20-fache Menge Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) eingebracht und nach 24-stündigem Stehen abfiltriert. Das Filtrat wurde bei 40°C im Rotationsverdampfer eingedampft, in 2 ccm absolutem Äthanol aufgenommen und nochmals das Lösungsmittel entfernt. Danach wurden die Lipide in Chloroform gelöst und nach Einengen der Chloroformmenge wie bereits beschrieben dünn-schichtchromatographisch getrennt. Bestimmt wurde das freie Cholesterin und die Cholesterinester.

Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Aliquote Teile der in jeweils 10 ccm Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) gelösten Acylester und der Cholesterinester bzw. des freien Cholesterin wurden in den zur Zählung vorgesehenen Gläsern eingedampft und der Rückstand in 10 ml PPO-POPOP Szintillatorlösung gelöst. Letztere bestand aus 5 g PPO und 0,3 g Dimethyl-POPOP in 1 Liter Toluol. Die Zählung erfolgte in einem "Tricarb"-Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer der Fa. Packard Instruments Co. (La Grange, U.S.A.) mit folgender Einstellung: Fenster A: 50, Fenster B: 100, Verstärkung: 7,6%. Gezählt wurde für jeweils 10 Minuten.

Der Cholesteringehalt wurde nach Zak und Mitarbeiter(55) bestimmt, der Acylestergehalt nach Fried und Hoeflmayr(56).

Reagenzien

Alle verwendeten Lösungsmittel besaßen p.a. Qualität. Petrol-äther(Kp 50-70°C) wurde von der Fa. Riedel-de Haën(Seelze b. Hannover), PPO sowie Dimethyl-POP von der Fa. Packard(Frankfurt am Main), Humanalbumin von den Behringwerken(Marburg), Fe III-Cloridlösung zur Bestimmung veresterter Fettsäuren von der Fa. Dr. Heinz Haury(München), 1-¹⁴C-Acetat von der New England Nuclear Corp.(Boston, U.S.A.) und 4-¹⁴C-Cholesterin von der CEA, Frankreich, bezogen.

Alle anderen Chemikalien waren Produkte der Fa. Merck(Darmstadt).

ERGEBNISSE

Den Ratten wurde in 2 Versuchsreihen jeweils 0,5 ccm einer 2%igen Formalinlösung intraperitoneal injiziert. Nach 0,5, 2, 6, 12, 24, 48 und 96 Stunden wurden jeweils 6 bis 9 Ratten getötet und die Nebennieren bei der ersten Versuchsreihe mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat und bei der zweiten mit $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholesterin inkubiert.

Auf die Injektion kam es bei den Tieren zu folgenden Veränderungen: Die 0,5 und 2 Stunden-Tiere waren stark benommen. Nach Eröffnen der Bauchhöhle fand sich eine leichte bis mäßige Injektion der Bauchgefäße, bei einigen Tieren auch seröses Exsudat. Die 6 und 12 Stunden-Tiere zeigten wieder eine größere Agitation. Die Hyperämie der Gefäße hatte sich verstärkt und es waren reichliche Mengen klarer, seröser Flüssigkeit im Bauchraum vorhanden. 24 Stunden nach der Injektion war das Exsudat unverändert. Die Gefäße hatten sich aber schwarz-rot verfärbt und auf den serösen Häuten zeigten sich Fibrinauflagerungen. Die Nebennieren waren schlaff und schlecht zu präparieren. Bei den Tieren der 48 und 96 Stunden-gruppe ging die Menge des Transsudates, das jetzt allerdings eitrig trüb war, merklich zurück. Dafür standen Verwachsungen und nekrotische Veränderungen an den Darmschlingen im Vordergrund. Die Schlingen lösten sich teilweise selbst vom Mesenterium ab. Das Fettgewebe des großen Netzes war stark vermindert. Die Schwere der Intoxikation geht auch aus der Tatsache hervor, daß nur 11 von 19 Ratten 4 Tage überlebten.

Für die verschiedenen Ergebnisse innerhalb jeder Gruppe wurde die Standardabweichung (57) vom Mittelwert errechnet. Die Signifikanz der Versuchswerte gegenüber den Kontrollwerten wurde nach R.A. Fisher und F. Yates (zit. n. Richterich-(58)-) bestimmt. Werte, bei denen p kleiner als 0,02 ist, sind statistisch signifikant.

In Tabelle I und in Tabelle II sind die Resultate der Organuntersuchung zusammengefaßt. Das Frischgewicht der Nebennieren in Bezug auf das Körpergewicht (Abb. 1) zeigt in beiden Versuchsreihen einen Anstieg von anfänglich 0,025% auf 0,035% nach 4 Tagen. Auch in den Versuchen von Stark (59) und Hauck (60) war das Nebennierengewicht nach Formalinbehandlung höher als das der Kontrolltiere. Nach Hauck ist dafür ein Einstrom von Wasser in das Gewebe verantwortlich. Dieser war bei den Tieren, die infolge der Vergiftung zugrunde gingen, am stärksten ausgeprägt.

Die Abbildungen 2, 3, 7, 8, 12, 13 und 17 zeigen, wie sich die Cholesterin- und Fettsäuresynthese aus Acetat, die Veresterung des Cholesterins und der Organgehalt an diesen Lipoiden während der Beobachtungszeit ändern. Um die Werte besser vergleichen zu können, erschien es sinnvoll, sie auf das Nebennierenfrischgewicht zu beziehen oder als spezifische Aktivität anzugeben.

Der Gehalt an Gesamtcholesterin fällt stetig bis zu einem Minimum von rund 30% des Ausgangswertes nach 12 Stunden ab (Abb. 5) und steigt danach für 36 Stunden wieder an, um nach weiteren 2 Tagen nochmals etwas abzusinken. Nur die 6, 12, 24 und 96 Stundenwerte sind gegenüber dem Ausgangswert signifikant erniedrigt. Die Cholesterinestermengen (Abb. 15) verhalten sich ähnlich. Sie sind aber gegenüber der Kontrollgruppe immer signifikant vermindert und fallen nach 12 Stunden sogar maximal um 85% ab. Darauf folgt eine ununterbrochene Wiedereinlagerung der Ester. Das freie Cholesterin (Abb. 18) bleibt während der ganzen Versuchsdauer bemerkenswert konstant. Der Gehalt an Fettsäuren (Abb. 10) ist nach 6 Stunden signifikant reduziert und nimmt bis zum 24 Stundenwert weiter ab. Nach 2 Tagen unterscheidet er sich infolge der inzwischen erfolgten Wiedereinlagerung von Fett statistisch nicht mehr vom Kontrollwert.

Die Neubildung von Cholesterin aus Acetat(Abb.4) nimmt in den ersten 6 Stunden nur geringfügig zu, vervierfacht sich aber nach 12 Stunden und bleibt noch für 2 weitere Tage wesentlich erhöht. Nach 4 Tagen entspricht sie wieder der ursprünglichen Höhe. Die Fettsäuresynthese(Abb.9) dagegen ist nach 6 und 24 Stunden deutlich vermindert. Die Cholesterinesteraseaktivität(Abb.14) nimmt nach 2 Stunden um 26% zu und fällt dann stetig bis zu einem Minimum bei 24 Stunden ab. Dies ist der einzige Wert, der sich von der Kontrollgruppe statistisch signifikant unterscheidet.

Die spezifische Aktivität des neugebildeten Cholesterins (Abb.6) und der Cholesterinester(Abb.16) ändert sich während des Versuches in analoger Weise. Sie ist bereits nach 0,5 bzw. 2 Stunden signifikant erhöht, erreicht nach 12 Stunden ein ausgeprägtes Maximum und sinkt dann wieder langsam ab. Die spezifische Aktivität der Acylester(Abb.11) dagegen zeigt keine signifikanten Änderungen.

In Tabelle III ist das Ergebnis eines Vorversuches für die Bestimmung der Cholesterinveresterung angegeben. Einmal wurden die Nebennieren bereits vor der Inkubation homogenisiert, ein anderes Mal wurden sie nur mit einer Schere geviertelt und erst nach dem Inkubieren im Potter-Elvehjem Glashomogenisator zerrieben. Es zeigte sich, daß bei beiden Methoden ungefähr die gleiche Menge Cholesterin pro mg Nebennierengewebe verestert wurde. Dies überrascht nicht, da an der Veresterung wahrscheinlich nur ein Enzym beteiligt ist. Bei der de-novo Synthese von Cholesterin aus Acetat-hier ist eine umfangreiche Stoffwechselkette beteiligt-ist der Einbau nach vorhergehender Homogenisation geringer(50).

TABELLE I: in-vitro Inkubation von Rattennebenieren mit 20 μ Ci 1-¹⁴C-Acetat
Neusynthese und Verhalten von Gesamtcholesterin und Acylestern in Abhängigkeit
von der Zeit nach i.p. Injektion von 0,5 ccm einer 2%igen Formalinlösung

Zeit nach der Formalininjektion	Stdn	Kontrollgruppe	0,5	2
Zahl der Tiere	n	7	8	8
Durchschnittliches Körpergewicht	g	128	107	118
Durchschnittliches Nebennierenfrischgewicht(FG)	mg	29,86	23,73	26,79
Nebennierengewicht in % des Körpergewichtes	%	0,0233	0,0222	0,0227

GESAMTCHOLESTERIN

I _{pm} /mgFG	11,37 $\pm$ 3,49	13,18 $\pm$ 9,16	13,94 $\pm$ 14,05
mg/mgFG 10 ⁻³	9,460 $\pm$ 2,280	10,679 $\pm$ 2,89	7,364 $\pm$ 2,66 0,207 $\pm$ 0,10
I _{pm} /mg	1246 $\pm$ 485	1269 $\pm$ 863	2142 $\pm$ 2467
I _{pm}	352 $\pm$ 184	292 $\pm$ 146	341 $\pm$ 304
mg	0,2845 $\pm$ 0,0944	0,2507 $\pm$ 0,0804	0,1967 $\pm$ 0,0730

ACYLESTER

I _{pm} /mgFG	164,66 $\pm$ 51,90	136,54 $\pm$ 34,19	191,63 $\pm$ 9360
mg/mgFG 10 ⁻²	5,435 $\pm$ 1,213	4,691 $\pm$ 1,130 0,507 $\pm$ 0,40	4,660 $\pm$ 0,550
I _{pm} /mg	3018 $\pm$ 1046	2919 $\pm$ 427	4039 $\pm$ 1721 0,257 $\pm$ 0,20
I _{pm}	5080 $\pm$ 2440	3175 $\pm$ 1071	5211 $\pm$ 2963
mg	1,6210 $\pm$ 0,5641	1,0734 $\pm$ 0,2192	1,2568 $\pm$ 0,3033

FORTSETZUNG TABELLE I:

Stdh	6	12	24	48	96
n	6	8	10	7	6
g	105	99	106	119	133
mg	23,57	22,85	30,16	34,65	46,85
%	0,0224	0,0231	0,0285	0,0291	0,0352

GESAMTCHOLESTERIN

Ipm/mgFG	15,82±7,96 0,25>p>0,20	42,06±8,11 0,001>p	26,96±8,36 0,001>p	27,34±11,07	13,29±1,41
10 ⁻³ mg/mgFG	3,838±1,044	2,877±0,922 0,001>p	4,797±1,306 0,001>p	8,115±1,651	6,042±1,403 0,02>p>0,01
Ipm/mg	4096±1677 0,005>p>0,001	15653±5039	5966±2017	3398±1011 0,005>p>0,001	2270±468 0,005>p>0,001
Ipm	370±175	938±218	800±225	944±457	616±227
mg	0,0903±0,0251	0,06327±0,0161	0,1394±0,0239	0,2680±0,0398	0,2683±0,0638

ACYLLESTER

Ipm/mgFG	76,96±57,50 0,01>p>0,005	135,42±32,15 0,10>p>0,05	103,23±25,34 0,005>p>0,001	120,11±40,90 0,20>p>0,10	138,76±40,80
10 ⁻² mg/mgFG	3,588±0,940 0,01>p>0,005	3,639±0,932	3,096±0,597	6,250±0,946 0,20>p>0,10	4,341±0,387
Ipm/mg	2054±677 0,05>p>0,025	3860±1136	3413±694	1990±948	3201±884
Ipm	1824±1080	3048±837	3063±536	4385±1883	6272±2209
mg	0,8464±0,2208	0,8145±0,2247	0,9169±0,1362	2,322±0,976	2,0352±0,7575

TABELLE II: in-vitro Inkubation von Rattennebennieren mit $0,05 \mu\text{Ci } 4\text{-}^{14}\text{C-Cholesterin}$

Veresterung des Cholesterins und Verhalten des freien Cholesterins und der Cholesterinester in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Injektion von $0,5 \text{ cm}$ einer 2% igen Formalinlösung

Zeit nach der Formalininjektion	Stdn	Kontrollgruppe	$0,5$	2
Zahl der Tiere	n	6	7	6
Durchschnittliches Körpergewicht	g	119	138	124
Durchschnittliches Nebenierenfrischgewicht(FG)	mg	31,22	33,22	30,17
Nebenierengewicht in % des Körpergewichtes	%	$0,0262$	$0,0241$	$0,0243$

CHOLESTERINESTER

Ipm/mgFG		$46,3 \pm 10,2$	$45,6 \pm 9,3$	$58,3 \pm 12,3$ $0,107 \pm 0,05$
mg/mgFG 10^{-2}		$2,360 \pm 0,217$	$1,406 \pm 0,301$ $0,001 \pm 0,001$	$1,291 \pm 0,310$
Ipm/mg		1992 ± 558	3439 ± 1212 $0,027 \pm 0,01$	5765 ± 1253
Ipm		1431 ± 278	1451 ± 88	1715 ± 285
mg		$0,7369 \pm 0,1191$	$0,4762 \pm 0,2011$	$0,3785 \pm 0,0656$

FREIES CHOLESTERIN

mg 10^{-2}		$5,612 \pm 1,501$	$7,031 \pm 2,232$	$5,168 \pm 1,157$
mg/mgFG 10^{-3}		$1,791 \pm 0,386$	$2,096 \pm 0,269$	$1,734 \pm 0,303$

FORTSETZUNG TABELLE II:

Stdh	6	12	24	48	96
n	6	8	7	7	5
g	128	122	140	137	119
mg	36,77	39,30	44,08	44,74	40,50
%	0,0287	0,0322	0,0315	0,0327	0,0340

CHOLESTERINESTER

Ipm/mgFG	44,5 $\pm$ 12,3	36,6 $\pm$ 5,6 0,05>p>0,025	32,1 $\pm$ 4,3 0,005>p>0,001	37,7 $\pm$ 6,2 0,10>p>0,05	40,0 $\pm$ 6,0
10 ⁻² mg/mgFG	0,564 $\pm$ 0,0581	0,3375 $\pm$ 0,1690	0,5087 $\pm$ 0,1151	0,9737 $\pm$ 0,4012	1,285 $\pm$ 0,3481
Ipm/mg	8061 $\pm$ 2659	13769 $\pm$ 6770	6681 $\pm$ 1904	4503 $\pm$ 1992	3341 $\pm$ 1091
Ipm	1542 $\pm$ 74	1429 $\pm$ 79	1408 $\pm$ 169	1673 $\pm$ 204	1589 $\pm$ 106
mg	0,2091 $\pm$ 0,0684	0,1309 $\pm$ 0,0628	0,2258 $\pm$ 0,0725	0,4304 $\pm$ 0,1634	0,5383 $\pm$ 0,2611

FREIES CHOLESTERIN

10 ⁻² mg	6,21 $\pm$ 1,02	6,01 $\pm$ 1,12	7,02 $\pm$ 2,94	8,55 $\pm$ 2,09	7,56 $\pm$ 1,35
10 ⁻³ mg/mgFG	1,758 $\pm$ 0,274	1,524 $\pm$ 0,231	1,550 $\pm$ 0,439	1,915 $\pm$ 0,386	1,875 $\pm$ 0,193

Werte, bei denen p kleiner als 0,02 ist, sind statistisch signifikant

TABELLE III: in-vitro Inkubation von Rattennebnieren mit 0,125 μ Ci 4-¹⁴C-Cholesterin
Cholesterinveresterung bei Inkubation der homogenisierten(A) und der gevierteilten Nebenniere(B).

	A				B			
	Nebennieren homogenisiert				Nebennieren gevierteilt			
Ratte	1	2	3	Mittelwert	1	2	3	Mittelwert
Körpergewicht g	187	195	194	192	161	168	159	162
Nebennierengewicht(FG) mg	54,728	54,664	63,636	57,674	69,726	51,212	44,366	55,099
Ipm Cholesterinester	3810	3997	4207	4004	3833	3660	4397	3957
Ipm/mgFG	69,6	73,2	66,1	69,6	54,9	71,4	99,2	75,1

Abb.1 : Das Nebennierengewicht in % des Körpergewichtes in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Injektion von 0,5 ccm einer 2%igen Formalinlösung

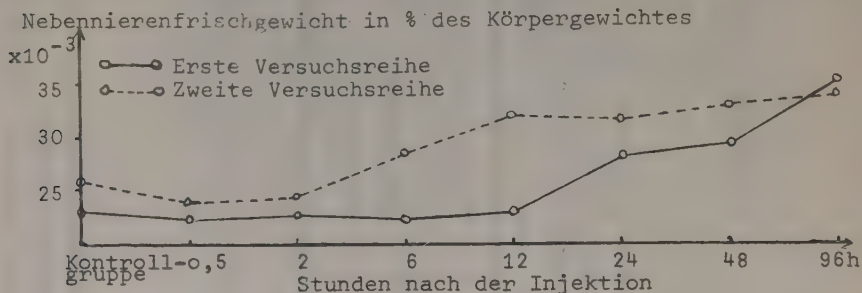


Abb.1

Abb.2-6: Inkubation der Nebennieren mit 20 μ Ci 1-¹⁴C-Acetat (Erste Versuchsreihe)
Neusynthese und Gehalt an Gesamtcholesterin in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Injektion von 0,5 ccm einer 2%igen Formalinlösung

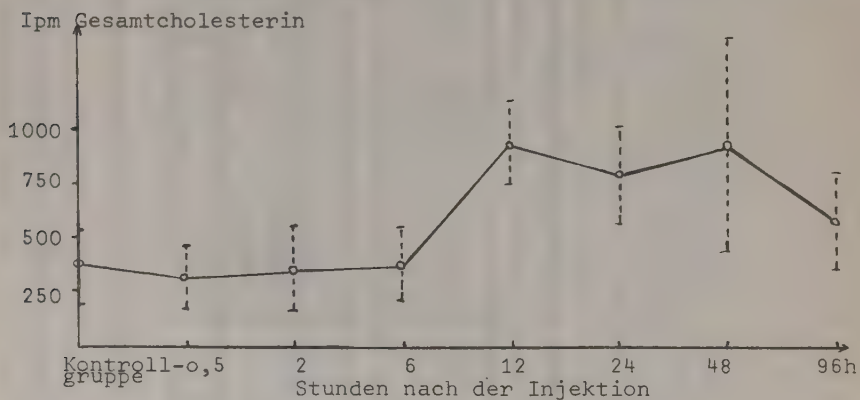


Abb.2

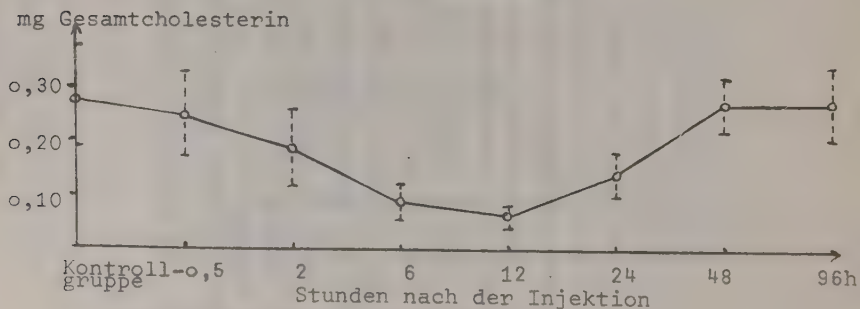
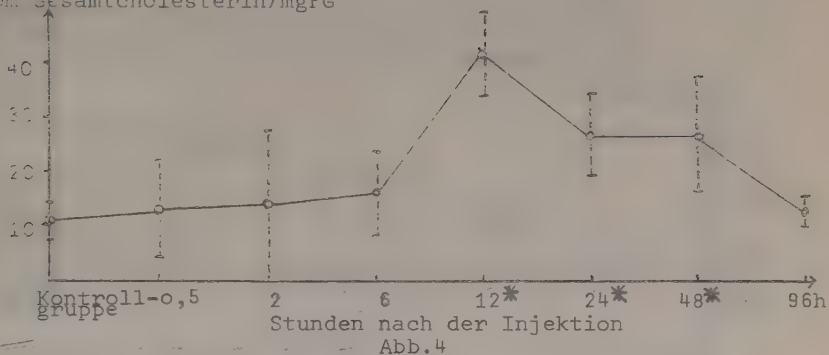
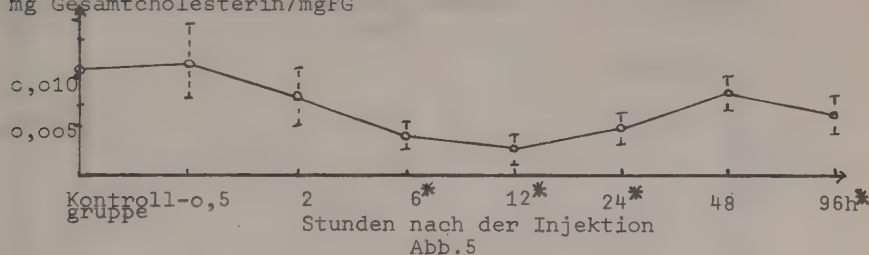


Abb.3

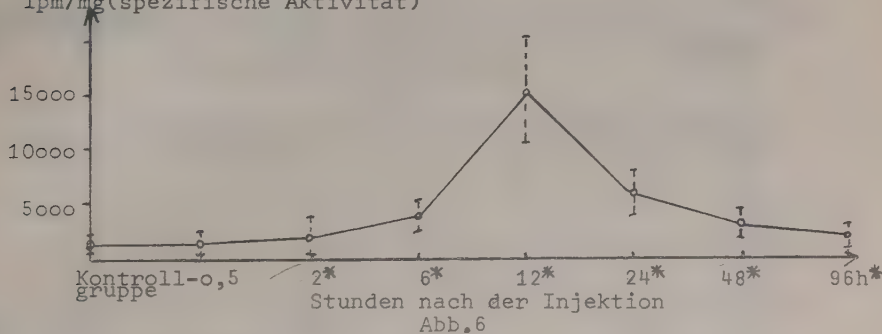
Ipm Gesamtcholesterin/mgFG



mg Gesamtcholesterin/mgFG

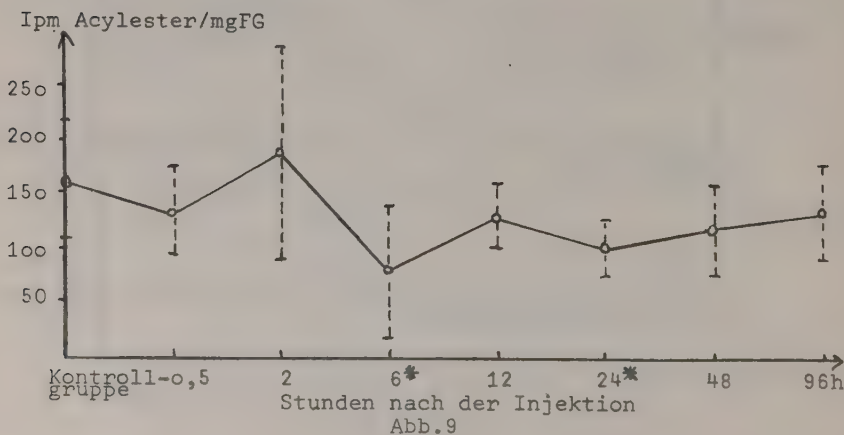
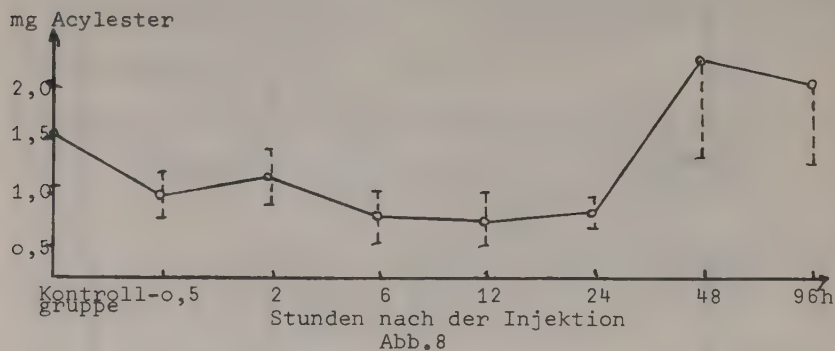
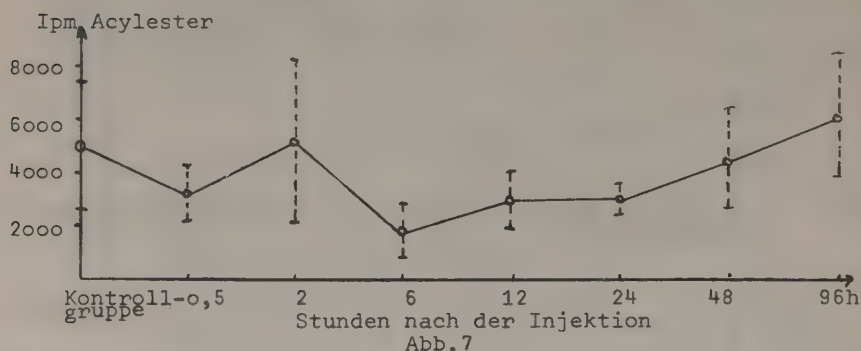


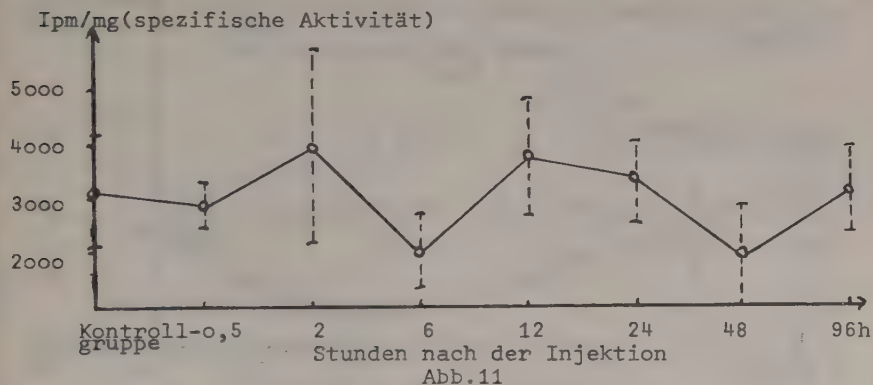
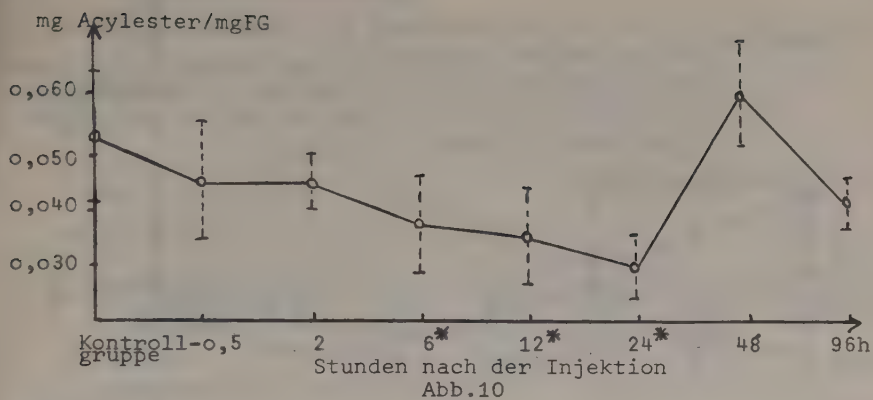
Ipm/mg(spezifische Aktivität)



Die mit einem Stern* gekennzeichneten Werte sind statistisch signifikant

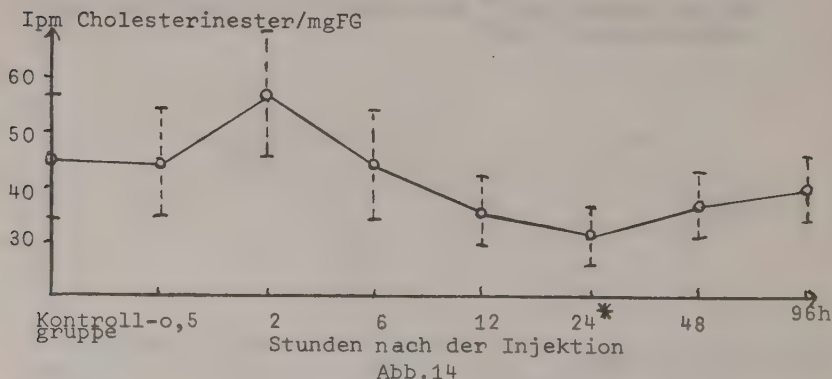
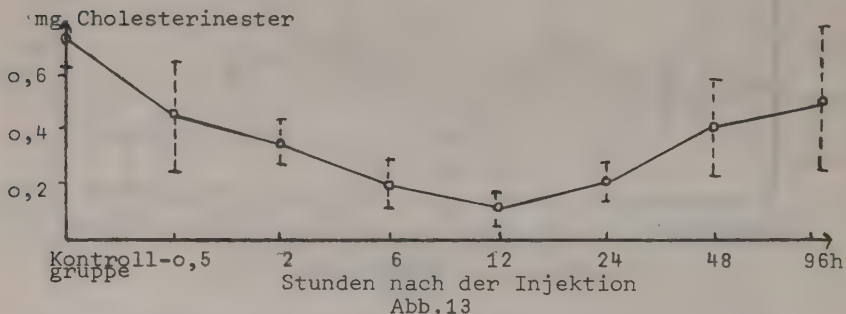
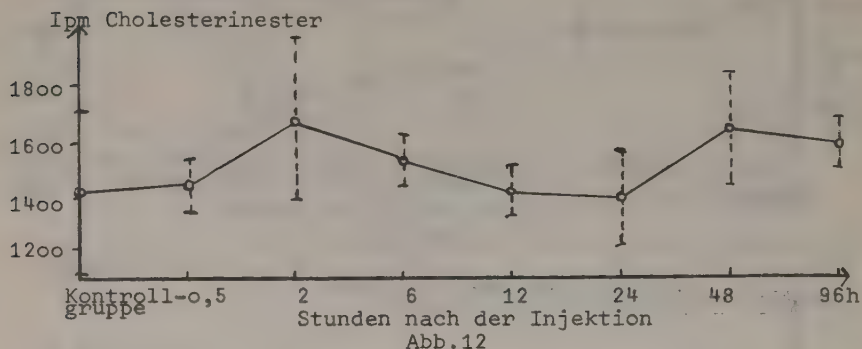
Abb.7-11: Inkubation der Nebennieren mit 20 μCi $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat
(Erste Versuchsreihe)
Neusynthese und Gehalt an Acylestern in Abhängigkeit
von der Zeit nach i.p. Injektion von 0,5 ccm einer
2%igen Formalinlösung

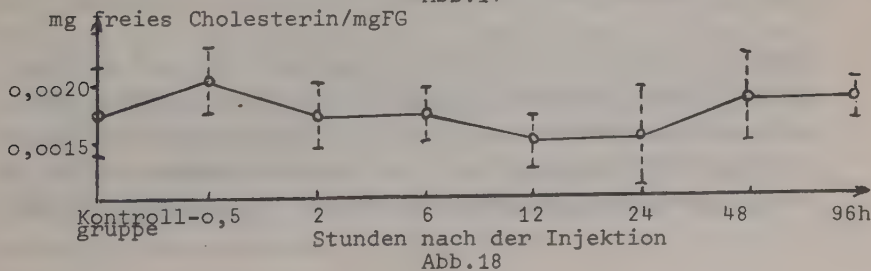
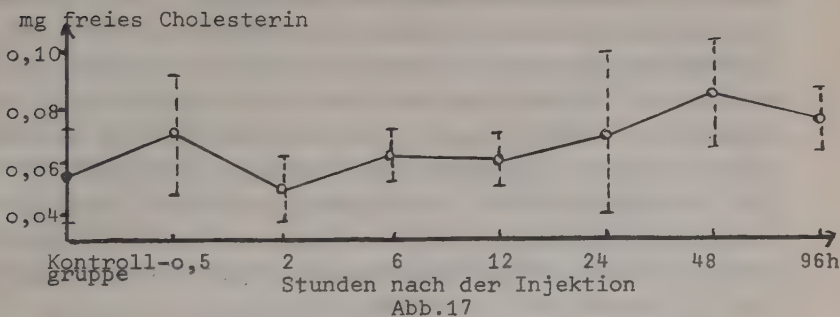
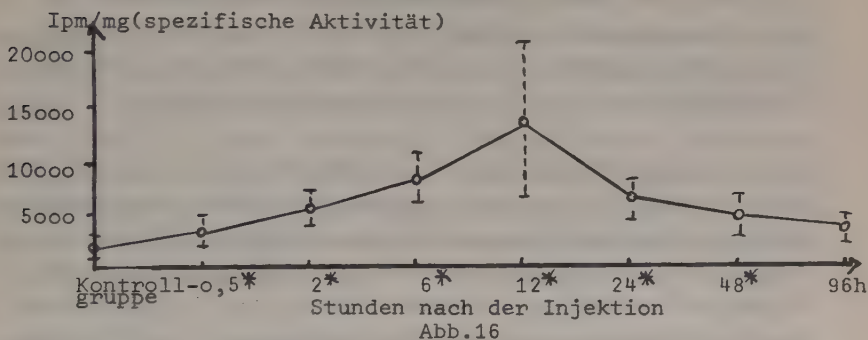
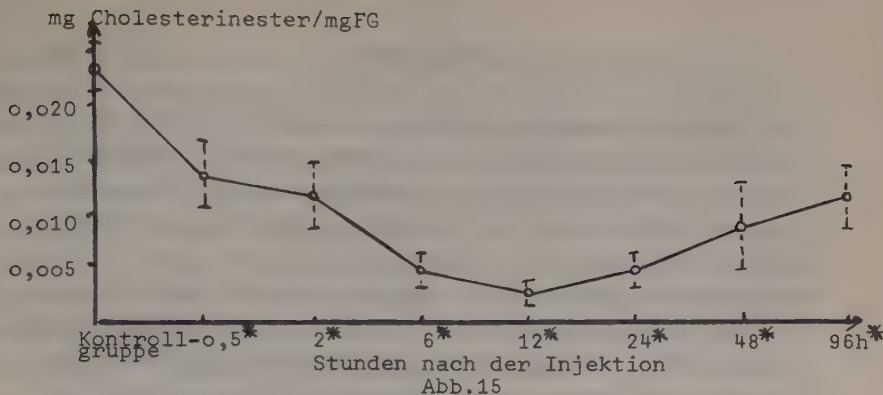




Die mit einem Stern* gekennzeichneten Werte sind statistisch signifikant

Abb.12-18: Inkubation der Nebennieren mit $0,05\mu\text{Ci } 4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholesterin (zweite Versuchsreihe)
Veresterung des Cholesterins und Gehalt an Cholesterinestern und an freiem Cholesterin in Abhängigkeit von der Zeit nach i.p. Injektion von $0,5\text{ ccm}$ einer 2%igen Formalinlösung





DISKUSSION

Der Cholesteringehalt der Nebenniere steht wie der Ascorbinsäuregehalt in direkter Beziehung zur Corticoidproduktion bzw.-Sekretion, kann also geradezu als Indikator der Organaktivität dienen und ist dementsprechend außerordentlichen Schwankungen unterworfen (12,13,14,16,50,61). Im nicht-stimulierten Organ lag bei den vorliegenden Versuchen der Cholesterinestergehalt bei 2,4% des Frischgewichtes. Dieser ist gegenüber Untersuchungen von Eberhagen (50), bei denen der Gehalt 4% betrug, etwas erniedrigt. Übereinstimmend mit Literaturangaben (16,50) befindet sich der größte Teil in Esterform im Gewebe abgelagert, da der Gehalt des freien Cholesterins nur 0,18% des Frischgewichtes betrug.

Wie erstmals der Arbeitskreis um Hechter (17,18) gezeigt hat, kann das Cholesterin der Nebenniere zum Aufbau der Steroidhormone verwendet werden, sodaß die Annahme naheliegt, daß das Organ sich dadurch gewissermaßen ein Depot an Stoffwechselvorläufern anlegt, um im Bedarfsfall die Corticoidsekretion rascher erfolgen zu lassen. Diese Auffassung steht im Gegensatz zu Vermutungen von Cushman (43), der eine einzeitige Totalsynthese der Steroidhormone direkt aus Acetyl-CoA annimmt. Da aber der Cholesteringehalt nach jeder Stimulierung der Nebenniere abnimmt (50), scheint es doch so zu sein, daß neben einer wahrscheinlich auch stattfindenden de-novo Synthese der Steroide aus Acetat vor allem das im Organ vorhandene Cholesterin umgesetzt wird. Der Gehalt an freiem Cholesterin ändert sich nur geringfügig; von der Entspeicherung werden nur die Esterformen betroffen.

Auch bei den vorliegenden Untersuchungen über die Wirkung eines Formalinstresses von verschiedener Dauer ergab sich eine ständige Verminderung der Cholesterinester während der ersten 12 Stunden bis zu 1/7 des Ausgangswertes. Der Verlust machte sich schon bei den nach 30 Minuten getöteten Tieren

bemerkbar. Dann folgte eine stetige Wiedereinlagerung von Cholesterinestern, die aber auch noch nach 4 Tagen deutlich gegenüber dem Kontrollwert vermindert waren. Bei einem analogen Versuch mit älteren Tieren hatte Eberhagen ebenfalls ein-allerdings weniger ausgeprägtes-Minimum nach 12 Stunden und einen Anstieg des Estergehaltes auf die ursprüngliche Höhe bereits nach 24 Stunden gefunden. Möglicherweise ist dafür eine erhöhte Widerstandskraft der schwereren und älteren Ratten verantwortlich. Das freie Cholesterin blieb während des ganzen Versuches bemerkenswert konstant.

Die de-novo Synthese des Cholesterins nahm zuerst nur geringfügig zu, stieg aber nach 12 Stunden-entsprechend der stärksten Verarmung an Cholesterinestern-fast um das Vierfache an und blieb noch für 2 Tage wesentlich erhöht. Durch die gesteigerte Synthese kann man die Zunahme des Cholesteringehaltes, die nach einem halben Tag erfolgt, erklären. Allerdings wurde nicht untersucht, ob außerdem möglicherweise vermehrt Cholesterin aus der Blutbahn aufgenommen wird.

Fazekas(62) berichtete, daß nach subkutaner Injektion von Formalin nur ein kürzerer Anstieg des Corticosterongehaltes im Blutserum mit einem Maximum nach 2 Stunden auftritt und daß bereits nach 5 Stunden die Menge dieser Hormone und damit wohl auch ihre Syntheserate unter dem Ausgangsniveau liegen. Wegen der Schwere der Allgemeinintoxikation kann man aber bei den vorliegenden Untersuchungen annehmen, daß der Bedarf und die Produktion von Rindenhormonen für einen wesentlich längeren Zeitraum erhöht sind, zumal auch Weisz und Mitarbeiter(63) nach intramuskulärer Injektion von Formalin einen 24stündigen Anstieg des Corticosterongehaltes im peripherischen Blut verzeichneten. So liegt die Annahme nahe, daß die gesteigerte Cholesterinsynthese nicht nur der Wiederauffüllung der Cholesterinvorräte, sondern auch direkt der Corticoidbiosynthese dient. Wie bereits erwähnt, glauben Ichii und Kobayashi(42), daß das freie Cholesterin der Mitochondrien nur teilweise für die Bildung der Rindenhormone verwendet wird.

Besonders Hikasa und Mitarbeiter(26) sehen das Cholesterin-arachidonat als den eigentlichen Stoffwechselvorläufer der Steroidhormone an. Nach Eberhagen könnte jedoch das mit Doko-satetraensäure veresterte Cholesterin in dieser Hinsicht eine größere Bedeutung haben, denn gerade ihr Anteil an den Fettsäuren änderte sich nach einem Stress in charakteristischer Weise.

Fukuda(24) hatte bei seinen Untersuchungen 2 Stunden nach einem Stress einen maximalen Corticosterongehalt in den Nebennieren festgestellt, der danach ständig abnahm. Gerade zu diesem Termin fand Eberhagen(50) ein Maximum an Dokosatetraensäure in den Nebennierencholesterinestern und bei den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich eine Zunahme der Cholesterinesteraseaktivität, die allerdings statistisch nicht signifikant war. Da auch die Cholesterinneusynthese aus Acetat während der ersten 6 Stunden kaum vermehrt war - nach Kahnt und Neher(39) ist das Cholesterin ein obligatorischer Vorläufer der Steroide - liegt eine Beziehung zwischen den Cholesterinestern, besonders den der Dokosatetraensäure, und der Corticoidbiosynthese nahe. Eine direkte Proportionalität ist jedoch zwischen beiden nicht wahrscheinlich, da die Ester nach der Hypothese nur speicherförmige Durchgangsstoffe darstellen, während die Corticoide ja Endprodukte eines komplexen Stoffwechselgeschehens sind.

Dauert der Formalinstress länger als 6 Stunden, so liegen andere Verhältnisse vor. Nach 12 Stunden steht einem Minimum an Cholesterinestern- und Dokosatetraensäure(50) - im Organ eine maximal gesteigerte Cholesterinsynthese gegenüber und nach einem Tag ist die Aktivität der Cholesterinesterase signifikant vermindert. Dies scheint darauf hinzuweisen, daß nach Erschöpfung der Cholesterinvorräte die Corticoidsynthese eher vom freien Cholesterin ausgeht. Ichii und Péron(40, 41, 42) haben ja nachgewiesen, daß in den Mitochondrien die Steroide aus freiem Cholesterin gebildet werden.

Der Fettsäuregehalt der Nebennieren beträgt bei den Kontrolltieren rund 5,4% des Frischgewichtes. Er ist erstmals nach 6

Stunden signifikant reduziert und fällt in den folgenden 18 Stunden stetig bis auf 57% des Ausgangswertes ab. Nach 2 Tagen erreicht er wieder die ursprüngliche Höhe, wobei eine vermehrte Aufnahme aus der Blutbahn wahrscheinlich ist. Der Abnahme der Fettsäuren entspricht nämlich keine gesteigerte Neusynthese aus Acetat in den Nebennieren, wie es beim Cholesterin der Fall ist. Die Produktion von Fettsäuren ist sogar nach 6 und 24 Stunden besonders deutlich vermindert. Interessant ist hier ein Vergleich mit den Untersuchungsergebnissen von Macho und Palkovič(64), die nach ACTH-Stimulierung über eine Abnahme der freien Fettsäuren in den Rattennebenieren berichten. Es wäre denkbar, daß dafür eine gesteigerte Veresterung von Cholesterin zu metabolisch aktiveren Verbindungen verantwortlich ist. Wie Pigafella und Macchitella(65) gezeigt haben, wird durch ACTH eine Lipase aktiviert, die einen vermehrten Fettabbau bedingt. White und Engel(66) vermuten deshalb, daß die freien Fettsäuren, die aus Triglyzeriden und Cholesterinestern stammen können, eine Quelle für den organogenen Acetyl-Co-A-Pool sind und so letztlich der Steroidsynthese dienen.

Zusammenfassend kann man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen so deuten, daß nach einem Formalinstress zuerst die Ester umgesetzt werden. Diese bilden einen Vorläuferpool und ermöglichen damit eine rasche Hormonsekretion. Bestimmten Cholesterinestern, nach Eberhagen(50) den Dokosatetraensäureestern, kann dabei eine besondere Bedeutung zukommen. Leider war die Zunahme der Cholesterinesteraseaktivität nach 2 Stunden nicht deutlich ausgeprägt. Sind die Cholesterinestervorräte erschöpft, wird die Cholesterinneubildung aus Acetat wichtig. Das synthetisierte freie Cholesterin wird nicht abgelagert, sondern wahrscheinlich gleich zu den Steroiden umgebaut. Eine Veresterung zur Herstellung eines aktiveren Substrates ist dann wohl nicht notwendig.

Der Abfall der Fettsäuren im Gewebe könnte teilweise auf einen

Verbrauch von Dokosatetraensäurecholesterinestern, teilweise auf einen vermehrten Abbau anderer Fettsäuren beruhen, die so der Bereitstellung von Acetyl-Co-A dienen. Da das Acetyl-Co-A zur Cholesterinsynthese benötigt wird, ist die Fettsäureneubildung während der gesteigerten Cholesterinsynthese in den Nebennieren reduziert.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ratten wurde 0,5ccm einer 2%igen Formalinlösung intraperitoneal injiziert und die Nebennieren in verschiedenen Zeitabständen nach dieser Behandlung entnommen. Die Organe wurden dann mit 1-¹⁴C-Acetat und 4-¹⁴C-Cholesterin inkubiert, um die Fettsäure- und Cholesterinsynthese und die Cholesterinesteraseaktivität untersuchen zu können. Das freie Cholesterin, die Cholesterin- und die Acylester wurden aus dem Lipoidgemisch dünnschichtchromatographisch abgetrennt.
2. Der Gehalt des Gesamtcholesterins und der Cholesterinester zeigte im Verlauf der Stressreaktion typische Veränderungen mit einem Minimum nach 12 Stunden. Die Fettsäuren waren im Organ nach einem Tag am stärksten vermindert.
3. Nach 12 Stunden war die Cholesterinneusynthese aus Acetat stark angestiegen und blieb noch für 2 Tage erhöht. Der Acetateinbau in die Fettsäuren ist besonders deutlich nach 6 und 24 Stunden gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt.
4. Die Menge des Cholesterins, die verestert wurde, war nach 2 Stunden leicht angestiegen. Nach einem Tag trat eine statistisch signifikante Erniedrigung auf.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Carrol, K.K.: J. Biol. Chem. 200, 287 (1953)
- (2) Carrol, K.K.: Endocrinology 48, 101 (1951)
- (3) Gleson, M.C., W.R. Bloor: J. Biol. Chem. 141, 349 (1951)
- (4) Bernard, L. u. Bigart: Compt. rends. soc. biol. (Paris) 54, 1400 (1902)
- (5) Bardier u. Bonne: Compt. rends. soc. biol. (Paris) 55, 355 (1903)
(4) u. (5) zit. n. Wolman (7)
- (6) Goormaghtigh, N. u. L. Elaut: Compt. rends. soc. biol. (Paris) 92, 733 (1925)
- (7) Wolman, M.: Lipids II, Histochemistry of Lipids in Pathology S. 316ff. In: Handbuch der Histochemie, herausgegeben von W. Graumann u. K.H. Neumann, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1964
- (8) Selye, H.: Nature (London) 138, 32 (1936)
- (9) Selye, H.: Brit. J. exp. Path. 17, 234 (1936)
- (10) Selye, H.: Endocrinology 21, 169 (1937)
- (11) Sayers, G., M.A. Sayers, A. White u. C.N.H. Long: Proc. Soc. Exp. Biol. 52, 200 (1943)
- (12) Sayers, G., M.A. Sayers, E.G. Fry, A. White u. C.N.H. Long: Yale J. Biol. Med. 16, 316 (1944)
- (13) Sayers, G., M.A. Sayers, T.Y. Linag u. C.N.H. Long: Endocrinology 37, 96 (1945)
- (14) Sayers, G., M.A. Sayers, T.Y. Linag u. C.N.H. Long: Endocrinology 38, 1 (1946)
- (15) Mouriquand, G. u. A. Leulier: Compt. rends. soc. biol. (Paris) 93, 1314 (1925)
- (16) Popjak, G.J.: J. Path. Bact. 56, 485 (1944)
- (17) Hechter, O. u. G. Pincus: Physiol. Rev. 34, 459 (1954)
- (18) Hechter, O. u. M.H. Solomon, A. Zaffaroni u. G. Pincus: Federation Prod. 13, 188 (1954)
- (19) Dailey, R.E., L. Swell, H. Field jr. u. C.R. Treadwell: Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 105, 4 (1960)
- (20) Grant, J.K.: Symp. Biochem. Soc. 18, 24 (1960)

- (21) Dailey, R.E., L.E.Swell u.R.C.Treadwell: Arch. Biochem. 99, 334 (1962)
- (22) Dailey, R.E., L.E.Swell u.R.C.Treadwell: Arch. Biochem. 100, 360 (1963)
- (23) Dailey, R.E., L.E.Swell u.R.C.Treadwell: Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 110, 571 (1962)
- (24) Fukuda, H.: Arch. Japan. Chir. 34, 529 (1965)
- (25) Muraoka, R.: Arch. Japan. Chir. 34, 35 (1965)
- (26) Hikasa, Y., M.Nagase, H. Fukuda u.R.Muraoka: Proc. symp. Chem. Physiol. Path. 3, 89 (1963)
- (27) Tamaki, Y.: Arch. Japan. Chir. 30, 611 (1961)
- (28) Kumano, M.: Arch. Japan. Chir. 31, 115 (1962)
- (29) Stoffel, W.: 16. Mosbacher Colloquium, 28.-30. April 1965
- (30) Roberts, K.D., L.Bandi, H.J. Calvin, W.D. Drucker u.S. Liebermann: J. Amer. Chem. Soc. 86, 958 (1964)
- (31) Drayer, N.M., D.Roberts, L.Bandi u.S. Liebermann: J. Biol. Chem. 239, 3112 (1964)
- (32) Brady, R.O.: J. Biol. Chem. 193, 145 (1951)
- (33) Haynes, R., K.Savard u.R. Dorfmann: J. Biol. Chem. 207, 925 (1954)
- (34) Hechter, O., M.H. Solomon, A. Zaffaroni u.G. Pincus: Arch. Biochem. Biophys. 46, 201 (1953)
- (35) Zaffaroni, A., O. Hechter u.G. Pincus: J. Am. Chem. Soc. 73, 1930 (1951)
- (36) Bligh, E.G., R.D. Heard, V.J. O'Donnel, J.L. Webb, M. Saffran u.E. Schonbaum: Arch. Biochem. Biophys. 58, 249 (1955)
- (37) Hall, P.E.: Biochemistry 2, 1232 (1963)
- (38) Armstrong, O.T., J.O'Brien u.R.O. Greep: Endocrinology 75, 488 (1964)
- (39) Kahnt, F.W. u.R. Neher: Helvetica Chimica Acta 49, 725 (1966)
- (40) Ichii, S., S. Kobayashi u.M. Matsuba: Steroids 5, 666 (1965)
- (41) Péron, F.G.: Biochim. Biophys. Acta 82, 125 (1964)
- (42) Ichii, S. u. Kobayashi, S.: Endocrin. Japan. 13(I), 39ff. (1966)
- (43) Cushman jr., P.C. Dickson u.J.G. Hilton: J. Clin. Invest. 43, 1270 (1964)
- (44) Srere, P.A., L.I. Chaikoff u.W.G. Sauben: J. Biol. Chem. 176, 829 (1948)
- (45) Shimizu, K., M. Hayano, M. Gut u.R. J. Dorfmann: J. Biol. Chem. 236, 695 (1961)

- (46) Solomon, S., P. Lewitaw u. S. Bieberman: Rev. Can. Biol. 15, 829 (1948)
- (47) Shimuzu, K., M. Gut u. R. J. Dorfmann: J. Biol. Chem. 237, 699 (1962)
- (48) Chaudhuri, A. C., Y. Harada, K. Shimuzu, M. Gut u. R. J. Dorfmann: J. Biol. Chem. 237, 703 (1962)
- (49) Bladon, P. in: R. P. Cook: Cholesterol Chemistry, Biochemistry and Pathology, Academic Press Inc., Publ. New York 1958, S. 89
- (50) Eberhagen, D.: Untersuchungen zur Beeinflussung des Lipidstoffwechsels in den Nebennieren von Ratten, Habilitationsschrift, München 1966
- (51) Folch, J., M. Lees u. G. H. Stanley: J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)
- (52) Schlenk, H.: Urea Inclusion Compounds of Fatty Acids, J. Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids, Vol. 2, 243 (1954)
- (53) Gellerman, J. L.: Anal. Chem. 32, 1412 (1960)
- (54) Portman, O. W. u. R. J. Havel: J. Lipid. Res. 2, 357 (1962)
- (55) Zak, B., N. Moss, A. Y. Boyle u. A. Zlatkis: Anal. Chem. 26, 776 (1954)
- (56) Fried, R. u. J. Hoefl-Mayr: Klin. Wschr. 41, 727 (1963)
- (57) Richterich, R.: Klinische Chemie, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, S. 32 (1965)
- (58) Fisher, R. u. F. Yates in Richterich, R.: Klinische Chemie, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, S. 40, 1965
- (59) Stark, E., J. Fachet u. K. Mihály: Endokrinologie (Heft 1-2) 30 (1965)
- (60) Hauck, O.: Untersuchungen zur Beeinflussung des Lipidstoffwechsels in den Nebennieren von Ratten nach einer Formalinvergiftung, München, S. 26, 1967 Inaugural-Dissertation
- (61) Long, C. N. H.: Bull. N. Y. Acad. Med. 23, 260 (1947)
- (62) Fazekas, G. u. A. T. Fazekas: Endokrinologie 50, (3-4) (1966)
- (63) Weisz, P., T. Kadas, P. Köves u. L. Ritter: Endokrinologie 38, 80 (1959)
- (64) Macho, L. u. M. Palkovič: Physiol. Bohemoslov. 14 (6), 563 ff (1965)
- (65) Pigafelta, P. u. E. Machitella: Chir. Pathol. Sper. 5, 397 (1957)
- (66) White, J. E. u. F. L. Engel: J. Clin. Invest. 37, 1556 (1958)

Herrn Privatdozenten Dr. D. Eberhagen danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank der medizinisch-technischen Assistentin Fräulein G. Plette, deren praktische Hilfe mir sehr wertvoll war.

LEBENS LAUF

Ich, Josef Gotthard Müller, wurde am 13.9.1942 als Sohn des Kaufmanns Josef Gotthard Müller und seiner Ehefrau Dora, geb. Lorenz, in Tetschen, CSR, geboren.

1948 trat ich in Bad Ischl in die Volksschule ein. Von 1956-1962 besuchte ich das Deutsche Gymnasium in München und legte dort 1962 die Reifeprüfung ab.

Vom Wintersemester 1963/1964 bis zum Sommersemester 1965 studierte ich an der Universität München Chemie, vom Wintersemester 1965/1966 bis zum Wintersemester 1970/1971 Humanmedizin. Im Anschluß an das Wintersemester 1970/1971 legte ich ebenfalls an der Universität München das medizinische Staatsexamen ab.

